

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/71032 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/22 [JP/JP]; 〒665-0804 兵庫県宝塚市雲雀丘山手2-21-23 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02327
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 23 日 (23.03.2001) (74) 代理人: 志村光春(SHIMURA, Mitsuharu); 〒150-0031 東京都渋谷区桜丘町9-3 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-084264 2000年3月24日 (24.03.2000) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ビー・エム・エル (BML, INC.) [JP/JP]; 〒151-0051 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長野 誠 (NAGANO, Makoto) [JP/JP]. 伊藤真由美 (ITO, Mayumi) [JP/JP]. 提著幸子 (SAGEHASHI, Yukiko) [JP/JP]. 服部浩明 (HATTORI, Hiroaki) [JP/JP]. 江頭 徹 (EGASHIRA, Toru) [JP/JP]; 〒350-1101 埼玉県川越市駒場1361番地1 株式会社 ビー・エム・エル 総合研究所内 Saitama (JP). 山下静也 (YAMASHITA, Shizuya) [JP/JP]; 〒663-8174 兵庫県西宮市甲子園四番町11-22 Hyogo (JP). 松澤佑次 (MATSUZAWA, Yuji)
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING RISK FACTOR FOR THE ONSET OF ARTERIOSCLEROSIS

(54) 発明の名称: 動脈硬化症発症危険因子の検出方法

(57) Abstract: A method of detecting a risk factor for the onset of arteriosclerosis in a subject on the basis of the relevance of gene mutations in CETP gene (in particular, mutations at (1) guanine at the -69-position of CETP protein gene; (2) the site encoding leucine at the 151-position of CETP protein encoded by CETP gene; (3) the site encoding arginine at the 201-position and alanine at the 202-position of the same; or (4) the site encoding arginine at the 282-position of the same) to the risk for arteriosclerosis, thereby detecting arteriosclerosis.

(57) 要約:

CETPの遺伝子の遺伝子変異、特に、①CETP蛋白の遺伝子の-69番目のグアニン、②CETPの遺伝子によってコードされるCETP蛋白の151番目のロイシンをコードする部位、③同201番目および202番目のアルギニンおよびアラニンをコードする部位または④同282番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子変異と動脈硬化の危険度を関連付けて、被験者の動脈硬化発症の危険因子を検出して、動脈硬化を検出する方法である。

WO 01/71032 A1

明細書

動脈硬化症発症危険因子の検出方法

技術分野

本発明は、疾病の検出方法に関する技術分野の発明である。より具体的には、本発明は、被験者における動脈硬化を検出する方法に関する発明である。

背景技術

高脂血症が、心筋梗塞をはじめとする動脈硬化症の主要な危険因子の一つであることは、実に多くの疫学的研究で証明されている。例えば、コレステロールについてみれば、血清総コレステロール値 200mg/dL に対して、同 240mg/dL では冠動脈疾患の相対危険度が約 2 倍に増加している。さらに、血清総コレステロール値が 300mg/dL になると、前記の危険度が 3 倍以上となる。また、大規模介入試験の成績から、これらの高脂血症状態を改善することにより虚血性心疾患の発症や、それによる死亡を減少させることが、明らかになってきている。これらのことから、血清総コレステロール値は、日本においては 200mg/dL 未満を適正域とし、200－219mg/dL を境界域、そして 220mg/dL 以上を高コレステロール血症としている。日本動脈硬化学会では、他の冠動脈疾患危険因子の有無も考慮して血清総コレステロール値の薬物療法適用基準や治療目標値を細かく規定している。

今や、高脂血症が、致死性の心筋梗塞をはじめとする動脈硬化症の主要な危険因子であることは疑いの余地はない。

一言で、高脂血症といっても、様々なタイプのものが知られている。最も代表的なタイプとしては、家族性高コレステロール血症（FH）が挙げられる。かかる高脂血症は、低比重リポ蛋白受容体（LDL-R）に支障があり、血清中のコレステロールを細胞内にうまく取り込めないために惹き起こされる高脂血症である。

一方、LDL-Rあるいはスカベンジャー受容体を介して、末梢組織に取り込

まれ、蓄積した余剰のコレステロールは、通常は、高比重リポ蛋白（HDL）により、引き抜かれ、肝臓等へと逆転送されるが、このコレステロールの逆転送系が正常に機能しているか否かが、細胞にコレステロールが正常に取り込まれるか否かと同様に、高脂血症や動脈硬化症の進展において重要な意味を有している。

このコレステロールの逆転送系には、コレステロールエステル転送蛋白〔本明細書においては、CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein の略称) とも記載する〕とHDLが非常に大きく関わっている。

CETPは、動脈硬化症に対して防御的に働くHDLを質的、量的に制御する重要な作用をもつ蛋白である。

HDLが動脈硬化症に対し防御的作用を有することは、多くの疫学研究により示され、周知の事実となっている。これは、コレステロールが末梢組織ではほとんど異化されず、胆汁酸への転換のためには血漿リポ蛋白を介して肝臓に輸送される必要があることと関連している。すなわち、HDLが、動脈硬化症に対して防御的に働くのは、HDLが末梢組織に蓄積したコレステロールをくみ出し、それを肝臓まで運ぶ働きを持つためと考えられている。

HDLのこのような作用は、多くの動物実験で確認されている。例えば、実験動物に、HDLの主要構成アポ蛋白であるApo A Iを投与することや、ヒトApo A Iを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、HDLが増加し、コレステロール負荷食による動脈硬化症の進展が抑制されることなどが示されている。

また、細胞レベルの実験でも、次々とHDLの抗動脈硬化作用が確認されている。例えば、脂質成分をほとんど含まないHDLの亜分画である、pre β HDLが、末梢組織からのコレステロールの引き抜き作用を有する事が示されている (Fielding J. Lipid Res 36:211-228, 1995)。

このように、今やHDLが末梢組織のコレステロールを引き抜き、抗動脈硬化的に作用していることは疑う余地もない。

1965年に、血清を37℃にインキュベーションした実験で、トリグリセライド (TG) やコレステロールエステル (CE) が、リポ蛋白間で転送されることが観察され (Nichol et al., J. Lipid Res, 6:206-210, 1965)、その後、この転

送に関与する蛋白として、CETPがヒト血漿より部分精製された(Chajek et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A., 75:3445-3449, 1978)。現在は、ヒト血漿の $d > 1.21 \text{ g/mL}$ 分画より、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー、CM-セファロースカラムクロマトグラフィーに続き、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー等の工程を経て、完全に精製されている。なお、更に幾つかのCETPの精製法が報告されているが、基本的工程は、これと同様である。

CETPは、476個のアミノ酸残基からなる糖蛋白であり、分子量は64000~74000と、精製法による糖鎖の変動により、若干異なった数値が報告されている。また、CETPは、非極性アミノ酸に富み、極めて疎水性が強く、酸化による失活を受けやすいことが知られている。

ヒトCETP遺伝子は、約25Kbで、16個のエクソンと15個のイントロンからなり、第16番染色体の長腕(16q12-16q21)に存在することが知られている(Agellon et al., Biochemistry, 29:1372-1376, 1990)。また、ヒトCETPのcDNAは、ウサギCETPのcDNAと約80%の相同性を有することが知られている。

末梢組織に蓄積した余剰のコレステロールは、HDLにより引き抜かれ、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の作用により、HDL上でエステル化されコレステロールエステル(CE)となる。このCEを、CETPが、超低比重リポ蛋白(VLDL)や中間比重リポ蛋白(IDL)あるいは低比重リポ蛋白(LDL)などのApo B含有リポ蛋白に転送する。それと同時に、その交換反応として、これらのリポ蛋白からTGを受け取る。CEに富んだApo B含有リポ蛋白は、肝臓のLDL-Rにより取りこまれ、代謝される。こうして末梢から肝臓への、いわゆるコレステロール逆転送系が完結する。

一方、逆に、低CE、高TGとなったHDLにおいては、肝性トリグリセリドリパーゼ(HTGL)の働きでTGが分解され、相対的に高アポ蛋白、低脂質の小さな粒子(HDL₃)となって、再び末梢組織からのコレステロールくみ出し能を回復するものと考えられている。

このように、コレステロールの逆転送系には、LCAT、リポ蛋白インリバ

ーゼ (LPL)、HTGLなど多くの酵素や、CETP、リン脂質転送蛋白 (PLTP)、Apo AI、Apo B、Apo CIII などの多くの蛋白が関わっており、中でも、CETPは、その中心的役割を果たしている。

CETPの病理的意義ないし臨床的意義は、その活性が大きく変動した症例、なかでも欠損症、すなわちCETP活性やCETP蛋白が欠失した患者で明らかにされている。山下らは、多くのCETP完全欠損症の患者を解析し、以下の成績を得ている (Atherosclerosis, 70:7-12, 1988、医学の歩み, 172:291-296, 1995)。

CETP完全欠損症の患者の血清脂質プロファイルでは、総コレステロールは高値で、HDLコレステロール (HDL-C) は、正常の3~6倍と極めて高値を示した。アポ蛋白ではApo AI、CIII、Eが著しく増加し、Apo Bは低値傾向を示した。HDL-Cの増加は、HDL₂分画のみにみられた。これらのリポ蛋白を、電気泳動法で更に詳細に解析すると、LDLは、polydisperseで小粒子化し、CEに乏しく、逆にHDLはCEに富み、粒子の巨大化が認められた。これらの結果から、CEに富み均一な成熟LDLの生成には、CETPが必要であることが判明した。

血漿CETP活性やCETP蛋白量が、健常人の約半分程度のCETP欠損症のヘテロ接合体では、血清脂質、リポ蛋白分画のコレステロール値、アポ蛋白値およびHDLの粒子サイズは、CETP完全欠損症、すなわちホモ接合体と正常との中間的な値を示す。しかし、HDL-Cについては、正常値を示すものもある。CETP欠損症のホモ接合体、ヘテロ接合体および正常コントロールを含む集団においては、CETP活性はHDL₂コレステロール値と負の相関を示す。従って、血漿CETP蛋白量や活性が、HDLの量ならびに質を調節する主要な因子であることは明らかである。

CETP欠損症ホモ接合体に見られる異常リポ蛋白と細胞の相互作用を検討すると、CETP欠損者のCEに乏しいApo B含有リポ蛋白は、正常のApo B含有リポ蛋白に比して線維芽細胞のLDL-Rに対する親和性が乏しいことが明らかにされている (Sakai N, Eur J Clin Invest, 25:332-339, 1995)。また、HDLについては、CETP欠損者のCEに富む大きなHDLは、マクロファ-

ジに対する抗泡沫化作用ならびに脱泡沫化作用が著しく低下している (Ishigami M, J Biochem, 116:257-262, 1994)。また、CETP欠損症に見られる大粒子HDLは、精製CETPを添加することにより消失し、HDLよりも小さな、VHDL類似の小さな粒子に変換される (Yamashita S, Ann N Y Acad Sci U.S.A., 748:606-608, 1995)。このVHDL類似粒子をゲル濾過法により精製し、その性状を分析すると、この粒子はリン脂質と、主としてApo A Iよりなり、アセチル化LDLによる、マクロファージの泡沫化を強く抑制するとともに、いったんコレステロールを蓄積したマクロファージの脱泡沫化をも強力に促進した。すなわち、抗泡沫化、脱泡沫化能を失ったHDLに対し、その機能を回復する作用をCETPが発揮した。

これらの結果は、いずれもCETP欠損が、コレステロール逆転送系において不利に働くことを示している。

ヒトCETP遺伝子を導入したトランスジェニックマウスも種々作製され、このようなトランスジェニックマウスにおける脂質代謝動態が検討されている。

マウスではCETP活性は本来ヒトに比べ低く、リポ蛋白もHDLが主で、ヒトとはかなり異なるため、その結果を直接ヒトに当てはめることには慎重でなくてはならない。しかし、CETPの機能を知る上で有用な知見も多く得られている。

Agellon らは、ヒトCETP遺伝子をマウスに組み込み (CETP-Tg)、これを発現誘導した場合のHDL-Cの変化を観察した (J Biol Chem, 266:10796-10801, 1991)。通常食摂取時で、CETP-Tg群では、HDL-Cが15~27%減少し、高脂肪食摂取時にはこの傾向が顕著となった。

Hayek らは、ヒトApo A Iを発現するトランスジェニックマウス (A-I-Tg) と、ヒトCETPを発現するトランスジェニックマウス (CETP-Tg) を交配して得た、A-I/CETP-Tgを用いて、CETPのHDL-CやHDL粒子サイズに及ぼす影響を調べた (J Clin Invest, 90:505-510, 1992)。CETP-Tg群では、non-Tgに比べて著明なHDL-Cの低下が認められ、HDL粒子径の減少が確認された。A-I/CETP-Tg群では、さらにこの傾向が著しかった。さらに、CETP-Tg全体においてCEのApo B

含有リポ蛋白への転送が高まるため、HDLのターンオーバー(turn over)も亢進していることを示した。

Jiang らは、CETP-Tgの発現レベルを調節しながら、LDL-Rとの関係を検討している(J Biol Chem, 268:27406-27412, 1993)。その結果、血清CETPの濃度が上昇するほど、血清中のVLDL-C、LDL-CならびにApoB濃度が増加した。CETP-Tgでは、肝臓のLDL-RのmRNA量が、non-Tgに比べて最大で約1/2に低下し、血中CETP濃度とこのmRNA量は負の相関を示した。また、CETP-Tgでは、肝臓のコレステロール、CE含量も増加し、逆にHMG-CoAリダクターゼおよびコレステロール7 α -ヒドロキシラーゼのmRNA量が減少していた。このことは、CETPの過剰発現によって、VLDL、LDLへのCE転送が亢進し、肝臓への取りこみも増加し、最終的に肝LDL-Rの、ダウンレギュレーション(down regulation)をきたしたものと考えられた。

以上、多くの実験により、CETPがコレステロール逆転送系に対して生体内で促進的に機能することが明らかとなっている。

山下らは高HDL血症、低CETP者が高頻度集積する秋田県大曲市で疫学研究を行なった(Hirano k et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(6):1053-1059, 1997)。

この地域においては、高HDL血症の頻度が他の地域に比し極めて高く、その理由として、CETP遺伝子イントロン14のスプライシング異常によるCETP欠損者が他の地域の5~8倍の頻度で認めらる事を明らかにした。本地域では平均寿命が日本人の平均に比しやや短く、また80歳以上の長寿者においては、高HDL血症ならびにCETP欠損症の頻度が80歳未満の群に比較してむしろ少なかった。さらにこの地域で安静時心電図で虚血性変化の所見を有する者の頻度とHDLの関係を見ると、HDL-C値が60mg/dL付近が最低となり、これよりHDL-Cが高くなるとむしろ頻度が増加していた。従ってこの地域のCETP欠損による高HDL血症は、動脈硬化に対して抵抗性を有するのではなく、むしろ、その逆であると推察された。

さらに、米国コロンビア大学のTall, A.R. らは、日系米人のCETP欠損者の

疫学調査で、CETP欠損が認められる者の方が、そうでない者との比較において、冠動脈疾患が顕著に認められたことを述べている (Zhong S. et al., J. Clin. Invest. 15:97(12):2917-2923, 1996)。

CETP欠損症をまねくCETP遺伝子変異や、機能変化を伴うCETP遺伝子の多型は、これまでに日本での研究を中心に報告されている。具体的には、ナンセンス変異としては、エクソン6にコードされる181番アミノ酸グリシン (Gly (GGA)) が停止コドン (TGA) になるG181X (Arai T, J Lipid Res, 37:2145-2154, 1996)、エクソン10にコードされる309番アミノ酸グルタミン (Gln (CAA)) が停止コドン (TAA) になるQ309X (Gotoda T, Biochem Biophys Res Commun, 194:519-524, 1993) などがある。スプライシング異常を伴うものとしては、イントロン14スプライスドナー部位の1番目の塩基グリシン (G) がアデニン (A) に置換したもの (Int14+1G→A) (Brown M, Nature, 342:448-451, 1989、Yamashita S, Biochem Biophys Res Commun, 170:1346-1351, 1991) や、イントロン14スプライスドナー部位の2番目の塩基チミン (T) の後にTが挿入されたもの (Int14+3Tins) (Inazu A, J Clin Invest, 94(5):1872-1882, 1994)、さらに、イントロン10スプライスドナー部位の2番目の塩基TがGに置換したもの (Int10+2T→G) (Sakai N, J Lipid Res, 37:2065-2073, 1996) などがある。

また、CETP活性が低下すると考えられている機能多型として、エクソン15にコードされる442番アミノ酸アスパラギン (Asp (GAC)) がグリシン (Gly (GGC)) に置換するD442G (Taskahashi K, J Clin Invest, 92:2060-2064, 1993) がある。その他、I405V、R451Qなどが知られているが、その生理的、機能的変化は明確でない。さらに、血清CETP濃度の変動に関係していると考えられているイントロン1Taq1B多型 (Freeman D J, Arterioscler Thromb, 14:336-344, 1994) などが報告されている。

CETP欠損を伴う遺伝子変異では、Int14+1G→A変異が一番頻度が高い。日本人を対象とした検討結果 (Hirano K, Atherosclerosis, 100:85-90, 1993) では、HDL-Cが、100mg/dL以上の集団においては、対立遺伝子が、共に、Aの変異アレルであるホモ接合体は、171例中6例 (3.5%) 出現し、

片側の対立遺伝子にAの変異アレルをもつヘテロ接合体は、同48例(28.1%)みられ、Aの遺伝子頻度は0.1754であった。また、HDL-Cが、60~100mg/dL未満の集団89例では、ホモ接合体はみられず、ヘテロ接合体が11例(12.4%)みられるに止まり、Aの遺伝子頻度も0.0618と低かった。さらに、一般集団512例でみた場合、ホモ接合体は出現せず、ヘテロ接合体も5例(0.98%)と明らかに少なく、Aの遺伝子頻度も0.0049と極めて低値であった。以上の結果からも、CETP遺伝子変異が、CETPの発現ないしHDLの血中濃度に深く関与していることがわかる。

しかし、他のG181X変異、Q309X変異、Int10+2T→G変異およびInt14+3Tins変異などは、その出現が極めて稀である。

すなわち、血中CETP蛋白が検出されないCETP完全欠損症の約半数は、Int14+1G→A変異ホモ接合体として同定されるが、残りを他の既知の変異だけで説明することは到底できない。また、この他イントロンや転写制御領域の変異は殆ど報告がない。

一方、D442G多型の臨床像については多くの検討が行われており、その出現頻度は一般集団で7%程度、HDL-Cが80mg/dL以上の集団では、30%程に上昇すると言われている。I405V、R451Q多型についても頻度や臨床像の検討が行われているが、疾患との関係は必ずしも明確にはなっていない。

このように、CETPにおける特定の機能やCETP量の異常と、遺伝子の変異の関係については、精力的に研究が重ねられ、その一部が解明されつつあるものの、現在までに報告されているInt14+1G→A変異やその他の変異で全てを説明することは出来ない。一方で、高HDL血症をまねく血清CETP低値の原因を、CETP遺伝子変異やこの遺伝子の制御以外の生体内の酵素あるいは蛋白等で、全てを明確に説明することも、現在はできない。

そこで、本発明が解決すべき課題は、CETP欠損の原因となる新たな、かつ、高頻度の遺伝子変異を見出し、かかる遺伝子変異についての知見を基に、動脈硬化症の予防や進展遅延に寄与すべき手段を見出すことである。

発明の開示

本発明者は、この課題の解決に向けて、CETP欠損の原因となる新たな、かつ、高頻度の遺伝子変異の検索を行うべく、検討を重ねた。

具体的には、血清脂質が正常値である者に比して、血清CETP活性値が40%以下と明らかな活性低下が認められた高HDL血症13例を対象に、これらのCETP遺伝子解析を行った。

その結果、目的とする遺伝子変異が、①CETP蛋白の遺伝子の-69番目のグアニン、②CETPの遺伝子によってコードされるCETP蛋白の151番目のロイシンをコードする部位、③同201番目および202番目のアルギニンおよびアラニンをコードする部位並びに④同282番目のアルギニンをコードする部位において認められることを見出した。そして、これらの新たな遺伝子変異および／または既に見出されている遺伝子変異と動脈硬化の危険度を関連付けて、被験者の動脈硬化症発症の危険因子を検出することが可能であることをも見出した。

すなわち、本発明者は、本願において、CETPの遺伝子の遺伝子変異と動脈硬化の危険度を関連付けて、被験者の動脈硬化症発症の危険因子を検出する、動脈硬化の検出方法（以下、本発明検出方法という）を提供する。特に、遺伝子変異が認められる部位が、①CETP蛋白の遺伝子の-69番目のグアニン、②CETPの遺伝子によってコードされるCETP蛋白の151番目のロイシンをコードする部位、③同201番目および202番目のアルギニンおよびアラニンをコードする部位並びに④同282番目のアルギニンをコードする部位から選ばれる1種または2種以上を用いることが、本発明検出方法においては、重要である。

なお、本明細書におけるアミノ酸の表記方法は、三文字法及び一文字法による。念のために、かかる表記内容をここに記載する。

【アラニン [Ala (三文字法、以下同様)、A (一文字法、以下同様)]

バリン [Val、V]、ロイシン [Leu、L]、イソロイシン [Ile、I]、プロリン [Pro、P]、フェニルアラニン [Phe、F]、トリプトファン [Trp、W]、メチオニン [Met、M]、グリシン [Gly、G]、セリン [Ser S]、スレオニン [Thr、T]、システイン [Cys、C]、グルタミン [Gln、Q]、アスパラギン [Asn、N]、チロシン [Tyr、

Y)、リジン [L y s、K]、アルギニン [A r g、R]、ヒスチジン [H i s、H]、アスパラギン酸 [A s p、D]、グルタミン酸 [G l u、E]」

また、本明細書中の表記で、例えば、「A 1 0 0 V」とは、「本来のアミノ酸配列における 1 0 0 番目のアラニンが、バリンに置換されている変異」を示すものとする。

図面の簡単な説明

第1図は、CETP遺伝子の I n t 1 4 + 1 G→A変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

第2図は、CETP遺伝子の D 4 4 2 G変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

第3図は、症例11における、CETP遺伝子のエクソン1のダイレクトシーケンス法による塩基配列の結果を示した図面である。

第4図は、症例12における、CETP遺伝子のエクソン4、5のダイレクトシーケンス法による塩基配列の結果を示した図面である。

第5図は、症例9における、CETP遺伝子のエクソン7のサブクローンにおけるシーケンス法による塩基配列の結果を示した図面である。

第6図は、症例13における、CETP遺伝子のエクソン9のダイレクトシーケンス法による塩基配列の結果を示した図面である。

第7図は、CETP遺伝子の - 6 9 G→A変異の、転写活性に及ぼす影響の解析結果を示した図面である。

第8図は、CETP遺伝子の - 6 9 G→A変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

第9図は、CETP遺伝子の L 1 5 1 P変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

第10図は、CETP遺伝子の 6 8 0 del G G G→A A A C G変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

第11図は、CETP遺伝子の R 2 8 2 C変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

上述したように、本発明は、動脈硬化の関連遺伝子である CETP 遺伝子における遺伝子異常を検出することを前提とする、動脈硬化症発症の危険因子の検出によって行われる動脈硬化の検出方法である。

CETP 遺伝子およびこれがコードする CETP 蛋白については、すでに解析がなされている (Agellon et al., Biochemistry, 29:1372-1376, 1990、DDBJ/EMBL/GenBank データベース ACCESSION M32992 J02898 ~ M32998 J02898)。なお、CETP 遺伝子配列は、配列番号 1 に、CETP 蛋白のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示した。

また、前述したように、ヒト CETP の cDNA は、ウサギ CETP の cDNA と約 80% の相同性を有することが知られている。

この CETP 遺伝子の遺伝子変異と、CETP の異常により惹起されると考えられる現象、例えば、高 HDL 血症との相関関係を具体的に解析することにより、本発明検出方法において利用し得る、CETP 遺伝子の遺伝子変異を見出すことができる。すなわち、「高 HDL 血症を伴う人と健常人」等の組み合わせにおいて、CETP 遺伝子の変異部位と変異頻度、あるいはその変異により生ずる蛋白の機能を解析することにより、所望する遺伝子変異を見出すことができる。かかる作業の実際については、後述する実施例において、具体的に記載する。

なお、本発明において、「遺伝子変異」とは、ヒト染色体における遺伝子の変異を意味するものであり、遺伝子の塩基配列が野生型 (正常遺伝子の塩基配列) と異なる場合のことを意味するものである。また、遺伝子が、その塩基配列において、個体毎に異なる特異的な部位を保有している場合には、一般的にこれは、「遺伝子多型」として表現され得るが、本発明においては、この「遺伝子多型」も「遺伝子変異」の範疇に含まれるものとする。「遺伝子変異」は、その遺伝子の変異頻度、その mRNA の発現量、蛋白発現量、あるいは蛋白の機能等の多角的な解析により、同定される。平均して、数百塩基に 1 個程度、そのような「遺伝子変異」が存在すると考えられているが、遺伝子を直接的または間接的に解析

することにより、これを同定することが可能であり、また、その見出された遺伝子変異の家系における解析から、父方由来の染色体（アレル）と母方由来の染色体（アレル）とを判別することができる。

遺伝子変異部位における変化には、父方と母方由来の遺伝子のいずれかが、遺伝子変異部位において、塩基配列に置換が生じており、両者のアレルの遺伝子が、野生型の遺伝子の塩基配列と比較して、異なる塩基との置換が起こっている場合を「ホモ接合体」、同様に片方のアレルの塩基配列が野生型の塩基配列と比較して、異なる塩基との置換が起こっている場合を「ヘテロ接合体」として認められる。

本発明者は、後述するように、現在までに、CETP 遺伝子において見出され、動脈硬化症発症危険因子と相関関係が認められる遺伝子異常として、①CETP 蛋白の遺伝子の-69番目のグアニンにおける遺伝子変異（例えば、転写制御領域における制限酵素HapIIに対する感受性の有無として特定される）、②CETPの遺伝子によってコードされるCETP蛋白の151番目のロイシンをコードする部位における遺伝子変異（例えば、エクソン5領域において、配列番号39で表される mismatchプライマーを用いた場合の、制限酵素AluIに対する感受性の有無として特定される）、③同201番目および202番目のアルギニンおよびアラニンをコードする部位（例えば、エクソン7領域における制限酵素XcmIに対する感受性の有無として特定される）および④同282番目のアルギニンをコードする部位における遺伝子変異（例えば、エクソン9領域における制限酵素HaeIIIに対する感受性の有無として特定される）を見出している。

遺伝子異常部位における変化の検出方法としては、通常公知の方法、例えば、サザンブロット法を用いたRFLP法や、PCR-RFLP法、HET(hetero duplex analysis)法、DGGE法(denaturing gradient gel electrophoresis)法、DS(direct sequence)法、CCM(chemical cleavage mismatch)法、CDI(carbodiimid modification)法、さらにはPCR法を用いた一本鎖DNA高次構造多型解析法〔PCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism)法、以下、本明細書においてはSSCP法という〕、PCR/GC-clamp法等を用いることができる〔例えば、バイオマニュアルシリーズ1、遺伝子工学

の基礎技術、山本 雅編、羊土社（1993）等を参照のこと、特に、P C R / G C - clamp 法については、Myers, R. M., Sheffield, V., and Cox, D. R. (1988) in *Genomic Analysis: A Practical Approach*. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139 等を参照のこと] が、簡便かつ正確に遺伝子異常を特定し得るという点において、P C R / G C - clamp 法を選択することが好ましい。

なお、P C R / G C - clamp 法は、D G G E 法（DNA変性剤の直線的な濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルにおける、塩基置換を含む二本鎖DNA断片と含まない二本鎖DNA断片の、DNAを変性させるべきDNA変性剤濃度の相違に基づく移動度の差異を利用して、DNAの塩基置換を検出する方法）の変法であり、D G G E 法における、「複数の塩基置換がある場合に、ポリアクリルアミドゲルにおいて、最後に融解するドメインの塩基置換を検出することができない」という欠点を、G C 含量の高い領域（G C - clamp）を、塩基置換の検出対象であるDNA断片につなげることにより克服した方法である〔Sheffield, V. C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236等を参照のこと〕。

よって、P C R / G C - clamp 法の基本的操作等は、D G G E 法に準ずるが、塩基置換検出の対象となるDNA断片に、G C - clamp を付加する工程が必要となる。

本発明検出方法における、C E T P 遺伝子の遺伝子異常部位における変化の検出の対象となるDNAの出所は、特に限定されるべきものではなく、被験者の体細胞であれば、特に限定されない。例えば、末梢血や白血球等の血液検体を、本発明において好適に選択することができる。

被験者の検体細胞から、公知の方法を用いてゲノムDNAを抽出し、このゲノムDNAにおいて、特定の遺伝子部位における変化（具体的には、特定の遺伝子異常部位における塩基の置換）を検出する。

そして、この検出作業の結果、上述した特定の遺伝子部位に変化が認められた場合、この遺伝子部位の変化と動脈硬化の危険度を関連付けて、動脈硬化症発症の危険因子を検出することができる。この「動脈硬化症発症の危険因子の検出」とは、現に存在する動脈硬化症は勿論のこと、動脈硬化症が発症する高い蓋然性をも含有する概念である。すなわち、現に、動脈硬化症が認められなくても、C

E T P 遺伝子の特定部位に変化が認められる場合には、血清脂質代謝等において、C E T P が十分に本来の役割を果たすことができず、その結果、動脈硬化症が発症する可能性が高くなる。かかる動脈硬化症発生の高い蓋然性をも、動脈硬化症発症の危険因子として、本発明検出方法において検出することが可能となる。

C E T P が本来の役割を果たしていない場合、血清脂質中のH D L - C 値が高い場合が多く認められる。一般的に、H D L - C は、「善玉コレステロール」として把握されており、血清脂質中のH D L - C 値が高いからといって、動脈硬化症発症の蓋然性が高いとは、診断されがたい。そこで、このような血清脂質におけるH D L - C 値が高値を示し、一見、動脈硬化症発症の危険因子がほとんど認められないと思われる者に対して、本発明検出方法を行うことにより、高H D L - C 値の裏に隠れた動脈硬化症発症の危険因子を検出することが可能となる。

本発明検出方法により、C E T P 遺伝子に上述した特定部位の変化が認められる場合で、かつ、動脈硬化に深く関連する疾患、例えば、糖尿病、冠動脈疾患、高血圧等が被験者に認められる場合には、これらの疾患の一般的な治療に加えて、動脈硬化を改善する治療を行うことにより、被験者の動脈硬化症によるリスクを減ずることが可能となる。また、本発明検出方法により、C E T P 遺伝子に上述した特定部位の変化が認められる場合であっても、被験者が一見、健常人である場合は、予め、動脈硬化症の発症を予防し得る措置、例えば、食事や運動の指導・管理を行うことにより、被験者の動脈硬化症発症の危険因子を減ずることが可能となる。

本発明検出方法において、本発明において新たに見出されたC E T P 遺伝子の特定部位の異常と共に、既に見出されているC E T P 遺伝子の特定部位の異常、例えば、上述したG 1 8 1 X、Q 3 0 9 X、I n t 1 0 + 2 T → G、I n t 1 4 + 1 G → A、I n t 1 4 + 3 T i n s およびD 4 4 2 G等を組み合わせて検出することで、より動脈硬化症発症の危険因子の検出の確度を向上させることが可能となる。

実施例

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明する。ただし、本実施例は、

本発明の技術的範囲を限定することを意図するものではない。

1. CETP 遺伝子の解析

対象

正脂血症者（血清脂質が、正常域内にある者のこと、以下同様である）に比して、血清 CETP 活性が 40 % 以下と活性の低下が認められ、かつ、本人より本発明に係わる遺伝子解析実施の合意がなされた高 HDL 血症者 13 名を対象に CETP 遺伝子解析を実施した。

血清 CETP 活性の測定

CETP 活性測定は、加藤らの再構成 HDL を用いた方法 (Kato, H. et al., J Biol Chem, 264:4082-4087, 1989) に準じた方法にて実施した。すなわち、コレステリルエステル (CE) 部分を RI 標識したドナーリポ蛋白（再構成 HDL）とアクセプターリポ蛋白 (LDL) とを一定の比率で混合し、これに血清を加えて一定時間反応させた後、デキストラン硫酸沈殿法によって、ドナーリポ蛋白とアクセプターリポ蛋白を分離し、アクセプターリポ蛋白へ転送された放射活性を測定した。詳しくは以下のごとく測定した。

LDL の調製

ヒトプール血漿 400 mL から超遠心法により LDL（密度、 $1.019 < d < 1.063$ ）を調製した。EDTA 加血漿 1 mL 当たり 0.01851 g の KBr を加え、比重を 1.019 に合わせた。45000 rpm、12℃、16 時間（ローター：50.2Ti、遠心機：L-80、BECKMAN 社）で遠心した。遠心した後、チューブの上にある IDL より比重の小さい分画を取り除いた。下層（約 245 mL）を回収し、1 mL 当たり 0.0644 g の KBr を加え、比重を 1.063 に合わせた。再び、45000 rpm、12℃、20 時間の超遠心を行った。遠心した後、チューブの最上層の濃いオレンジ色の LDL を回収した。回収した LDL を、0.01 % NaN₃ 含有 PBS (pH 7.4) 2 L に対して、4℃、12 時間透析を行った。これを 3 回繰り返した。0.45 μm フィルターで、LDL 画分を濾過滅菌した後、Lowry 法 (Lowry, O. H. et al., J Biol Chem, 193:265-275, 1951) で蛋白定量を行い、蛋白換算で 3.25 mg/mL に調整した。このようにして調製した LDL は無菌的に 4℃ で保存した。

アポリポ蛋白A-Iの精製

ヒトプール血漿 500 mLより、CIBACRON BLUE 3GA Type3000-CL (SIGMA 社) およびDEAE Sepharose CL-6B (PHARMACIA 社) を用いて、Apo A-Iを精製した。精製したApo A-Iを脱脂処理した後、凍結乾燥を行った。6 M尿素含有PBS (pH 7.4) に溶解したApo A-Iを、0.1% コール酸ナトリウム含有PBS (pH 7.4) 2 Lに対して、4℃、12時間透析を行った (この透析は3回繰り返した)。透析終了後、Lowry法で蛋白定量を行った。

再構成HDLの作製

5.625 μ mol のコレステロール (SIGMA 社)、0.47 μ mol のコレステリルオリレート (SIGMA 社)、22.5 μ mol のフォスファチジルコリン (NAKALAI TESQUE社)、およびコレステリル 1-¹⁴C 標識オリレート (AMERSHAM社) をガラス遠心管に添加し、窒素気流下で乾燥させた後、1 mLのエタノールに溶解した。別のガラス管にPBS 20 mLを入れ、窒素気流下を強めに当てながら、スターラー (CORNING 社) で強く攪拌した。このガラス遠心管に、先に調製したエタノール溶液 1 mLを、26 Gの注射針 (テルモ社) を使用し、注入した。攪拌の速さを半分にして、5分間攪拌した。200 mM コール酸ナトリウムを1.9 mL加え、2分間攪拌した後、上述のごとく精製したアポリポ蛋白A-Iを18 mg添加し、さらに2分間攪拌した。PBSで25 mLに合わせた後、0.01% NaN₃ 含有PBS (pH 7.4) 2 Lに対して、4℃、12時間透析を行った。これを3回繰り返して、再構成HDLとした。

CETP 活性測定

上述のごとく調製した再構成HDL 50 μ L、3.25 mg/mL LDL 20 μ L、およびPBSにて40倍希釈した血清サンプル 80 μ L を混合し、37℃で30分間インキュベートした。反応後、氷冷した0.1% デキストラン硫酸 15 μ L、および60 mM塩化マグネシウム 15 μ L を加え良く攪拌した。これを氷上で20分間放置した後、12000 rpm、4℃で10分間遠心 (MRX-151、TOMY 社) を行った。次いで、上清を捨て、沈澱のLDLを、0.1 N NaOH 180 μ L で溶解した後、その150 μ L を分取し、放射活性を液体シンチレーションカウンター (LS5000TD、BECKMAN 社) で測定した。CETP活性は、同時に測

定した健常者（正脂血症者）コントロール血清のCETP転送率の平均値を100%とし、各検体のCETP転送率を対健常者コントロール%として求めた。なお、本CETP活性測定法において、正脂血症者49名（男性26名、女性23名）のCETP活性は、 $100 \pm 19\%$ （平均±標準偏差）であった。

対象症例13名における血清CETP活性値、およびHDL-C値を表にする。

第 1 表

症例No.	性別	CETP活性 (%)	HDL-C (mg/dL)
1	F (女性)	0	147
2	M (男性)	0	117
3	M	0	152
4	M	0	208
5	F	1	171
6	F	1	124
7	M	1	152
8	M	2	210
9	M	3	164
10	M	25	122
11	M	30	110
12	M	31	106
13	M	40	136

ゲノムDNAの抽出

高HDL血症者のゲノムDNAは、抗凝固剤EDTA 3Kを含む真空採血管を用いて末梢血を採取した後、QIAamp Blood Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した。

プライマーの設定

ヒトCETP蛋白をコードする遺伝子（配列番号1）、およびアミノ酸（配列番号2）は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースACCESSION M32992 J02898 ~M32998 J02898 (Agellon, L.B, et al.,) より入手した。

なお、CETP遺伝子の各エクソンの配列について、エクソン1は、配列番号1の388~505番目まで；エクソン2は、配列番号1の506~620番目まで；エクソン3は、配列番号1の621~755番目まで；エクソン4は、配

列番号1の756～826番目までエクソン5は、配列番号1の827～914番目まで；エクソン6は、配列番号1の915～984番目まで；エクソン7は、配列番号1の985～1045番目まで；エクソン8は、配列番号1の1046～1137番目まで；エクソン9は、配列番号1の1138～1317番目まで；エクソン10は、配列番号1の1318～1368番目まで；エクソン11は、配列番号1の1369～1533番目まで；エクソン12は、配列番号1の1534～1601番目まで；エクソン13は、配列番号1の1602～1635番目まで；エクソン14は、配列番号1の1636～1708番目まで；エクソン15は、配列番号1の1709～1794番目まで；エクソン16は、配列番号1の1795～1869番目までとして表される。

CETP遺伝子の各エクソンをPCR法で増幅するためのプライマーの設定は、コンピューターソフトGENETYX-MAC（ソフトウェア開発社）を用いて行った。ここにPCRプライマーの塩基配列を記載する。

CETP遺伝子変異解析用

Int14+1G→A変異

5' -CTT CTG TGC TCC AGG GAG GAC TCA -
3' (Forward : 配列番号3)

5' -CAG TTT CCC CTC CAG CCC ACA CAT -
3' (Reverse : 配列番号4)

*アンダーラインミスマッチ塩基

D442G変異

5' -CAG CAA AGG CGT GAG CCT CGT C-3'
(Forward : 配列番号5)

5' -CCC AGG AAT CCT GTC TGG GCC -3' (Reverse : 配列番号6)

*アンダーラインミスマッチ塩基

シーケンス解析用

エクソン1

5' -AAA ATG GTG CAG ATG GTG GAG GG-3'

(Forward : 配列番号 7)

5' - AAT CCC TAT ACC TGG CTG TTT GCA -

3' (Reverse : 配列番号 8)

エクソン 2

5' - AGC CCT CAT CCA CTG CCC TCC - 3' (Forward : 配列番号 9)

5' - CTG TTC CTC CCG CCA CCC TAC - 3' (Reverse : 配列番号 10)

エクソン 3

5' - CCC AAC ATC CTT CCT CAC TTC CA - 3' (Forward : 配列番号 11)

5' - AGA CCT CAT TCA GCC CTC CAC C - 3' (Reverse : 配列番号 12)

エクソン 4 およびエクソン 5

5' - CCT GGT GGT AAG CAT TCC TGT CA - 3' (Forward : 配列番号 13)

5' - TGG ACA CAC TAA CAG GAT GGG CA - 3' (Reverse : 配列番号 14)

エクソン 6

5' - CAG GGG CTC ATT GTG GTG CT - 3' (Forward : 配列番号 15)

5' - GAC CAC AGG GAG TCA GCC AG - 3' (Reverse : 配列番号 16)

エクソン 7

5' - TGC CAC TCC CAC CTT CTC CAT G - 3' (Forward : 配列番号 17)

5' - GCT CCC ACT GCT GTC TTC TGA G - 3' (Reverse : 配列番号 18)

エクソン 8

5' -GGT TGG GTA GCT GTG TGG ATG C-3'

(Forward : 配列番号 19)

5' -TGA CAG AAG CCG AAT AAG CCC TC-3'

(Reverse : 配列番号 20)

エクソン 9

5' -ACA CAG GGT CCA GCC AGC GTC-3' (Forward : 配列番号 21)

5' -TCC CTC CTC CCC ATG CGT GTG-3' (Reverse : 配列番号 22)

エクソン 10

5' -GGA CTT TAC TCC ACC CAC C-3' (Forward : 配列番号 23)

5' -GGA TTG GGG TAC GTG AGA TAA AC-3' (Reverse : 配列番号 24)

エクソン 11

5' -CCG AGC TAC TTC CTT TTC CCA GC-3' (Forward : 配列番号 25)

5' -AGT CAG TTC CCC CAC CAC CAC C-3' (Reverse : 配列番号 26)

エクソン 12

5' -AGG GTT GCT CTC TGC TTC GGG A-3' (Forward : 配列番号 27)

5' -GAG TTG ACC GCC CCC TTC TCT T-3' (Reverse : 配列番号 28)

エクソン 13

5' -GGA AGA TAA GAC CCT GCC TAG ATA-3' (Forward : 配列番号 29)

5' -CTT ATT TCC CCC AGT CTA TCC AAG-3' (Reverse : 配列番号 30)

エクソン14

5' -CTT CTG TGC TCC AGG GAG GAC T-3'

(Forward : 配列番号31)

5' -GGG CCA GGA CCG CTA AGT A-3' (Reverse
: 配列番号32)エクソン15およびエクソン16

5' -CCA AGA AGG GCT GAC TGG GGC T-3'

(Forward : 配列番号33)

5' -ACA CCA GGG TTC CAG CTG TGA-3' (Reverse : 配列番号34)

CETP転写活性測定用pCETP-570ベクター

5' -CAG CAC TTG GTC ATC TGG TCA C-3'

(Forward : 配列番号35)

5' -GTA AGT GGC TCG AGC CGT TCA GCC T
GG A-3' (Reverse : 配列番号36)

*アンダーラインXhoI認識部位

pCETP-164ベクター5' -AGT TGG GGT ACC CTT GTT GAA TGT C
TG GCT CTG AAC TC- 3' (Forward : 配列番号37)

*アンダーラインKpnI認識部位

-69G→A変異解析用5' -GAT GCA ACT GAT ACT TAC ACA ACC A
G-3' (Reverse : 配列番号38)L151P変異解析用5' -ATG CCC CTG ACT GCT ACC TGT CTT T
CC ATA AGC AGC-3' (Forward : 配列番号39)

*アンダーラインミスマッチ塩基

CETP遺伝子変異の検出

日本人において、高HDL血症者に高頻度に検出されるCETP遺伝子変異である、Int14+1G→A、およびD442G変異について解析を行った。Int14+1G→A変異は、イントロン14スプライシングドナーサイトの塩基GTがATに1塩基の置換が認められる。変異アレルから合成されたmRNAはスプライシングが正常に行われず、その結果、CETP蛋白が全く合成されなくなるという変異である (Brown M L, et al., Nature, 342:448-451, 1989)。一方、D442G変異は、1403番塩基がAからGに置換することにより、442番目のアミノ酸に対するコドンがGACからGGCに変化し、その結果、442番目のアミノ酸がアスパラギン酸 (Asp: D) からグリシン (Gly: G) に変化する。この変異により、血清中のCETP量が低下することが知られている (Sakai N, et al., Atherosclerosis, 114:139-146, 1995)。

PCR-RFLP法によるInt14+1G→Aの検出法

Int14+1G→A変異は、一塩基の置換により、制限酵素の認識部位は変化しないが、Reverse側のオリゴヌクレオチドプライマーにミスマッチ塩基を導入することにより、PCR-RFLP法による判定が可能である。抽出したゲノムDNA 0.5 µg/µLを用いて、各0.8 µMの配列番号3および4のオリゴヌクレオチドプライマー、各ヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を200 µM含有する50 µLのPCR反応液 [10mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂] に0.5 unitsのTaq DNA Polymerase (PERKIN ELMER社) を加えて、PCR反応を行った。PCR反応の条件は、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で1分間のサイクルを35回繰り返し、最後は72℃で10分間反応を行い、目的の140bpのPCR産物を得た。PCR反応の確認は、5 µLのPCR産物を、3%アガロースで電気泳動を行い、0.5 µg/mLエチジウムブロマイドで染色を行い、確認した。この5 µLのPCR産物を制限酵素Nde I (宝酒造社) 5 unitsで、37℃で一晩消化処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、Int14+1G→A変異を検出した。すなわち、野生型の場合、140bpのDNA断片は全く切断されないが、Int14+1G→A変異を有する場合、118bpと22bpの2つの断片に切断されることにより判定される (第1図)。

PCR-RFLP法によるD442G変異の検出法

D442G変異は、一塩基の置換により、制限酵素の認識部位は変化しないが、Forward側のオリゴヌクレオチドプライマーにミスマッチ塩基を導入することにより、PCR-RFLP法による判定が可能である。抽出したゲノムDNA 0.5 μ g/ μ Lを用いて、配列番号5および6のオリゴヌクレオチドプライマーで、上述のごとくPCR反応を行い、目的の122bpのPCR産物を得た。この5 μ LのPCR産物を制限酵素SalI（東洋紡社）4unitsで、37℃で一晩消化処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、D442G変異を検出した。すなわち、野生型の場合、122bpのDNA断片は、101bpと21bpの2つの断片に切断されるが、D442G変異を有する場合、全く切断されないことにより判定される（第2図）。

対象症例13名におけるInt14+1G→AおよびD442G変異解析

PCR-RFLP法によりInt14+1G→A変異およびD442G変異の有無を解析した。血清CETP活性が0～5%（対健常者コントロール）と著しく低下していた9名のうち8名（症例1～8）は、Int14+1G→A変異のホモ接合体であり、症例9は、Int14+1G→A変異のヘテロ接合体のみ検出された。また、CETP活性が25%を示した症例10は、Int14+1G→A変異とD442G変異がともにヘテロ接合体である、いわゆる複合ヘテロ接合体であった。一方、CETP活性が30～40%の3名（症例11、12および13）には、D442G変異のヘテロ接合体のみ検出された。

Int14+1G→Aヘテロ接合体8名（男性4名、女性4名）およびD442Gヘテロ接合体21名（男性13名、女性8名）の血清CETP活性は、それぞれ、 $59 \pm 19\%$ および $82 \pm 23\%$ （平均±標準偏差）であることから、症例9、11、12および13の4名は、上記2種類のCETP遺伝子変異以外の変異を有している可能性が考えられた。そこで、これら4名の症例においてCETP遺伝子の全エクソンの配列を解析した。

CETP遺伝子の全エクソンの解析

PCR増幅

CETP遺伝子の各エクソンのPCR増幅は、抽出したゲノムDNA 0.5 μ

g/ μ L を用いて、各 0.8 μ M のそれぞれの合成オリゴヌクレオチドプライマー、200 μ M の dNTP を含有する 50 μ L の PCR 反応液に 0.5 units の Taq DNA polymerase を加えて、PCR 反応を行った。PCR 反応の条件は、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で1分30秒間のサイクルを35回繰り返し、最後は72℃で10分間反応を行い、目的のPCR産物を得た。PCR反応の確認は、5 μ L のPCR産物を、3%アガロースゲルで電気泳動を行い、0.5 μ g/mL エチジウムブロマイドで染色を行い、確認した。

塩基配列の決定

増幅したPCR産物について、オートシーケンサーを用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。すなわち、各エクソンのPCR産物を、Big Dye Terminator cycle sequencing Fs Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER 社) を用いて蛍光標識した後、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (APPLIED BIOSYSTEMS 社) を用いて塩基配列を決定した。

また、症例9のエクソン7のPCR産物は、TA Cloning Kit (INVITROGEN社) を用いて、サブクローニングしたクローンについて、上記と同様に塩基配列を決定した。

塩基配列解析の結果、解析した4名には、Int 14 + 1 G→AあるいはD 4 4 2 G 変異のヘテロ接合体と I 4 0 5 V 多型 (Agellon, LB, et al., Biochemistry, 29:1372-1376, 1990) 以外に、それぞれ1つずつ塩基置換が検出された。つまり、症例11には、転写制御領域の-69番目塩基 (mRNAに転写される開始塩基より69塩基上流) に野生型の塩基配列であるGの他にAが検出された (以下、-69 G→A 変異ともいう) (第3図)。また、症例12には、530番目の塩基に、野生型の塩基配列であるTの他にCが検出され、このTからCの一塩基の置換により、151番目のアミノ酸に対するコドンがCTCからCCCに変化し、その結果、この151番目のアミノ酸がロイシン (Leu: L) からプロリン (Pro: P) に置換が生じていることが同定された (以下、L 1 5 1 P 変異ともいう) (第4図)。また、症例9には、野生型の配列を有するクローン以外に、680~682番目の塩基に、野生型の塩基配列であるGGGが欠失し、新たにAAACGが挿入されたクローンが検出された。このGGGからAAACGの塩

基置換により、201番および202番目のアミノ酸に対するコドンがAGG/GCTからAAA/ACGに変化し、その結果、この201番および202番目のアミノ酸が、アルギニン (Arg:R) /アラニン (Ala:A) からリジン (Lys:K) /スレオニン (Thr:T) に置換が生じ、以降のアミノ酸への読み取り枠がずれて、218番目のアミノ酸がストップコドンに変化していることが同定された (以下、680del GGG→AAACG変異ともいう) (第5図)。

一方、症例13には、922番目の塩基に、野生型の塩基配列であるCの他にTが検出され、このCからTの一塩基の置換により、282番目のアミノ酸に対するコドンがCGCからTGCに変化し、その結果、この282番目のアミノ酸がアルギニン (Arg:R) からシステイン (Cys:C) に置換が生じていることが同定された (以下、R282C変異ともいう) (第6図)。

これらの4つの塩基置換のうち、-69G→A変異は、転写因子であるETS遺伝子ファミリーの結合する塩基配列である、PEA3モチーフ (コンセンサス配列; CAGGAAGT) の配列内に検出された塩基置換であった (Oliveira, HCF, et al., J Biol Chem, 271:31831-31838, 1996)。このPEA3モチーフのコンセンサス配列のうち、-GGAA-は、高度に保存された配列であり、事実、CAGGAAGTをCAAGGAAGTと一塩基置換を導入することにより、ETS1と結合しなくなることが知られている (Fisher, R J, et al., J Biol Chem, 267:17957-17965, 1992)。すなわち、CETP遺伝子の転写制御領域に検出された-69G→A変異により、核内転写因子の結合ができなくなり、mRNAの合成が低下することによって、CETP蛋白の発現が抑制あるいは低下している可能性が考えられる。

680del GGG→AAACG変異では、アミノ酸への読み取り枠がずれることにより、201番から217番までのアミノ酸配列は、正常のCETP蛋白とは全く異なるアミノ酸配列となり、さらに、218番目のアミノ酸がストップコドンに変化する。181番のアミノ酸がストップコドンに置換するナンセンス変異であるG181X変異のホモ接合体では、血清CETP活性が全く消失していることから (Arai T, J Lipid Res, 37:2145-2154, 1996)、680del GGG→AA

A C G 変異からも活性のある C E T P 蛋白は合成されないものと考えられた。

一方、L 1 5 1 P 変異と R 2 8 2 C 変異はアミノ酸が置換する、いわゆるミスセンス変異である。これら 2 種類の変異では、合成された C E T P 蛋白の立体構造が変化するために、変異 C E T P 蛋白が血中に分泌されなくなるか、あるいは、血中に分泌されても、活性 (C E 転送能) を失うものと考えられた。

まず、- 6 9 G → A 変異による C E T P 遺伝子の転写活性への影響を検討した。

C E T P 遺伝子の転写活性測定

C E T P 遺伝子の転写制御領域をレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の上流につなぎ、肝細胞由来の H e p G 2 細胞にレポーター遺伝子を導入し、ルシフェラーゼの発現量を C E T P 遺伝子の転写活性として評価した。なお、転写活性の測定には、C E T P 遺伝子の転写制御領域の - 1 ~ - 5 7 0 番塩基、あるいは - 1 ~ - 1 6 4 番塩基をつないだ 2 種類のレポーター遺伝子を用いた。

転写活性測定用プラスミド DNA の作製

- 6 9 G → A 塩基置換の検出された症例 1 1 のゲノム DNA 0. 5 μg/μL を用いて、配列番号 3 5 および制限酵素 X h o I 認識部位を導入した配列番号 3 6 のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上述のごとく、P C R 反応を行い、目的の 8 4 5 bp の P C R 産物を得た。この P C R 産物を制限酵素 K p n I および X h o I で消化し、得られた 5 6 4 bp の断片をピッカジーンベシックベクター 2 (東洋ビーネット社) の K p n I / X h o I 部位に、DNA Ligation Kit (宝酒造社) を用いて挿入した。この組み込んだベクターを大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞 (東洋紡社) にトランスフォーメーションした。トランスフォーメーションした、アンピシリン耐性の大腸菌を選択し、プラスミド DNA を QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。ベクターに挿入した転写制御領域の塩基配列の確認は精製プラスミド DNA を用いて行った。このようにして、野生型の配列を有する p C E T P - 5 7 0 ベクター (野生型)、および - 6 9 G → A 変異を有する p C E T P - 5 7 0 (- 6 9 A) ベクター (変異型) を作製した。また、同様に、制限酵素 K p n I 認識部位を導入した配列番号 3 7 および 3 6 のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた P C R により、1 8 2 bp の P C R 産物を得た。この P C R 産物を K p n I および X h o I で消化し、得られた 1 5 8

bpの断片を、上述と同様にピッカジーンベシクベクター2に挿入し、p C E T P - 1 6 4 ベクター（野生型）、および p C E T P - 1 6 4 (- 6 9 A) ベクター（変異型）を作製した。

ルシフェラーゼ活性測定

10%のウシ胎児血清、および10units/mLのペニシリン/ ストレプトマイシンを含んだダルベッコ変法イーグル必須培地（DMEM）中で、37℃、5%CO₂ インキュベーターで、HepG2細胞を培養した。トランスフェクションを行う前日に、細胞を6ウエルマイクロプレート（岩城硝子社）にウエル当たり、 1×10^5 個の細胞を蒔いた。24時間インキュベートした後、1μgのそれぞれのレポーターベクターを、FuGENE™ 6 transfection Reagent（BOEHRINGER MANNHEIM社）を用いてHepG2細胞にトランスフェクトした。また、pCMV-β-galプラスミドを同時にトランスフェクトした。さらに、24時間インキュベートした後、250μLのピッカジーン培養細胞溶解剤LCB（東洋ビーネット社）を用いて、細胞溶解液を調製した。ルシフェラーゼ活性は、ピッカジーンルシフェラーゼアッセイシステム（東洋ビーネット社）を用いて、ルミノメーター（Lumat LB9501、BERTHOLD社）を用いて測定した。また、β-ガラクトシダーゼ活性は、AURORA™ Gal-XE（ICN社）を用いて測定した。各ベクターの転写活性は、β-ガラクトシダーゼ活性1ユニット当たりのルシフェラーゼ活性（RLU/unit）として算出した。

-69G→A塩基置換による転写活性への影響

p C E T P - 5 7 0 (- 6 9 A) ベクター（変異型）の転写活性は、p C E T P - 5 7 0 ベクター（野生型）と比較し、0.3%とほぼ完全に転写活性が消失していた。一方、p C E T P - 1 6 4 (- 6 9 A) ベクター（変異型）の場合も、野生型の6.5%と著しく低下していた（第7図）。

以上の結果より、今回検出同定した-69G→A変異により、CETP遺伝子の転写活性が著しく低下することによりmRNAの合成が低下し、その結果、血中のCETP量（活性）が低下するものと考えられた。

新規CETP遺伝子変異の頻度解析

上述のごとく、検出同定されたCETP遺伝子変異、つまり、-69G→A変

異、L151P変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異の出現頻度を、血清HDL-Cが100mg/dL以上であり、かつ、本人より本発明に係わる遺伝子解析実施の合意がなされた高HDL血症者を対象にして、その出現頻度を検討した。なお、-69G→A変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異はともに、塩基置換により制限酵素の認識部位が変化することから、その判定にはPCR-RFLP法を用いた。一方、L151P変異は、一塩基の置換により、制限酵素の認識部位は変化しないが、Forward側のオリゴヌクレオチドプライマーにミスマッチを導入することにより、PCR-RFLP法による判定が可能である。

PCR-RFLP法による-69G→A変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 µg/µLを用いて、配列番号7および38のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上述のごとくPCR反応を行い、目的の371bpのPCR産物を得た。この5 µLのPCR産物を制限酵素HapII（宝酒造社）4 unitsで、37℃で一晩消化処理した後、3%アガロースで電気泳動を行い、-69G→A変異を検出した。すなわち、野生型の場合、371bpのDNA断片は、232bpと139bpの2つの断片に切断されるが、-69G→A変異を有する場合、全く切断されないことにより判定される（第8図）。

PCR-RFLP法によるL151P変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 µg/µLを用いて、配列番号39および14のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上述のごとくPCR反応を行い、目的の119bpのPCR産物を得た。この5 µLのPCR産物を制限酵素AluI（東洋紡社）4 unitsで、37℃で一晩消化処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、L151P変異を検出した。すなわち、野生型の場合、119bpのDNA断片は、84bpと35bpの2つの断片に切断されるが、L151P変異を有する場合、全く切断されないことにより判定される（第9図）。

PCR-RFLP法による680del GGG→AAACG変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 µg/µLを用いて、配列番号17および18のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上述のごとくPCR反応を行い、目的の240bp（変異：242bp）のPCR産物を得た。この5 µLのPCR産物を、

制限酵素 X c m I (第一化学社) 4 units で、37℃で一晩消化処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、680del GGG→AAACG変異を検出した。すなわち、野生型の場合、240bpのDNA断片は、123bpと65bpと52bpの3つの断片に切断されるが、680del GGG→AAACG変異を有する場合、242bpのDNA断片は、177bpと65bpの2つの断片に切断されることにより判定される(第10図)。

PCR-RFLP法によるR282C変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 µg/µL を用いて、配列番号17および18のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上述のごとくPCR反応を行い、目的の296bpのPCR産物を得た。この5 µL のPCR産物を制限酵素HaeIII (宝酒造社) 3 units で、37℃で一晩消化処理した後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、R282C変異を検出した。すなわち、野生型の場合、296bpのDNA断片は、156bp、118bp、および22bpの3つの断片に切断されるが、R282C変異を有する場合、156bpと140bpの2つの断片に切断されることにより判定される(第11図)。

高HDL血症者における出現頻度

血清HDL-C値が100mg/dL以上の高HDL血症者117名を対象に、-69G→A変異、L151P変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異の出現頻度について解析した。その結果、-69G→A変異のヘテロ接合体が、症例11を含め、計4名に検出され、その出現頻度は3.4%であった。一方、L151P変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異は、それぞれ発端者である症例12、9または13以外には検出されず、その出現頻度はともに0.9%であった。

以上述べたように、対象とした高HDL血症者13名の中から、新たに-69G→A、L151P変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異の4種類の変異が発見された。特に、-69G→A変異は、既知のInt14+1G→A変異よりは頻度的に少ないものの、これまでに報告されている他の変異に比べると頻度が高く、出現率はInt14+1G→Aに次ぐものと考えられる。

また、上述したように、-69 G→A変異は、CETPの転写制御領域内に存在し、このGからAに塩基置換することによって転写活性が著しく低下すると考えられ、これに関係する遺伝子変異保有者が実際に存在することを発見した。この転写領域がCETP蛋白発現に重要な働きをしていることは明白で、この領域を制御することにより血清CETP量をコントロールすることが可能となることが明らかとなった。すなわち、本領域に作用する物質あるいはこれらを誘導する物質は、血清CETP量を増加させることが期待できる。また、多くのCETP欠損症ヘテロ接合体者においては、正常のアレルの本領域に対する作用により、血清CETP量を増加させることが期待できる。更に、-69 G→A変異保有者においては、この変異配列にも作用する新たな物質により、血清CETP量を増加させることが可能となる。

また、CETP過剰発現者に対しては、上記と逆の作用により、血清CETPを制御することが考えられる。また、更に、本発明検出方法によりCETP完全欠損が同定されたものは、いわゆる遺伝子治療の対象者として確定され得る。

また、L151P変異、680del GGG→AAACG変異およびR282C変異は、その出現頻度は低いものの、Int14+1 G→A変異や-69 G→A変異、そして既知のマイナー変異と合わせることで、CETPの異常によって惹き起こされる動脈硬化発症の危険因子の確定効率を上げることに貢献できる。

産業上の利用可能性

本発明により、CETP欠損の原因となる新たな、かつ、高頻度の遺伝子変異が見出され、かかる遺伝子変異についての知見を基に、動脈硬化症の予防や進展遅延に寄与すべき手段が提供された。

請求の範囲

1. コレステロールエステル転送蛋白の遺伝子の遺伝子変異と動脈硬化の危険度を関連付けて、被験者の動脈硬化症発症の危険因子を検出する、動脈硬化の検出方法。
2. 遺伝子変異が認められる部位が、①コレステロールエステル転送蛋白の遺伝子の－69番目のグアニン、②コレステロールエステル転送蛋白の遺伝子によってコードされるコレステロールエステル転送蛋白の151番目のロイシンをコードする部位、③同201番目および202番目のアルギニンおよびアラニンをコードする部位並びに④同282番目のアルギニンをコードする部位から選ばれる1種または2種以上である、請求の範囲第1項記載の動脈硬化の検出方法。

第 1 図



M : 分子量マーカー
1 : 野生型
2 : 変異ヘテロ接合体
3 : 変異ホモ接合体

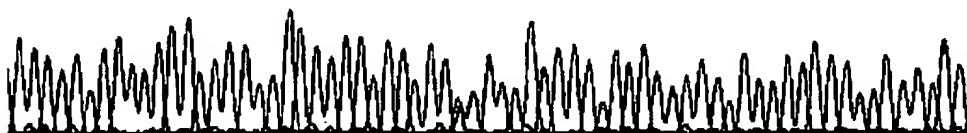
第 2 図



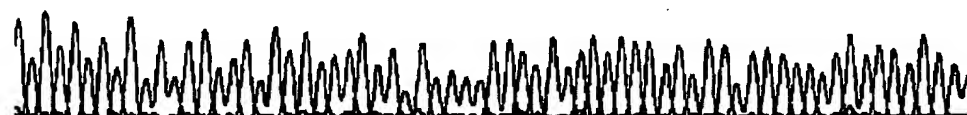
M : 分子量マーカー
1 : 野生型
2 : 変異ヘテロ接合体
3 : 変異ホモ接合体

第 3 図

-69
AATCTCTGGGGCCAGGAAGACCCTGCTGCCC G GAAGAGCCTCATGTTCCGTGGGGGCTGGGCGGACA
/
A



+1 +28
TACATATACGGGCTCCAGGCTGAACGGCTCGGG CCACTTACACACCACTGCCTGATAACC ATGCTG
Met Leu



第 4 図

151

Leu

Lys Leu / Leu His

Pro

530

T

525

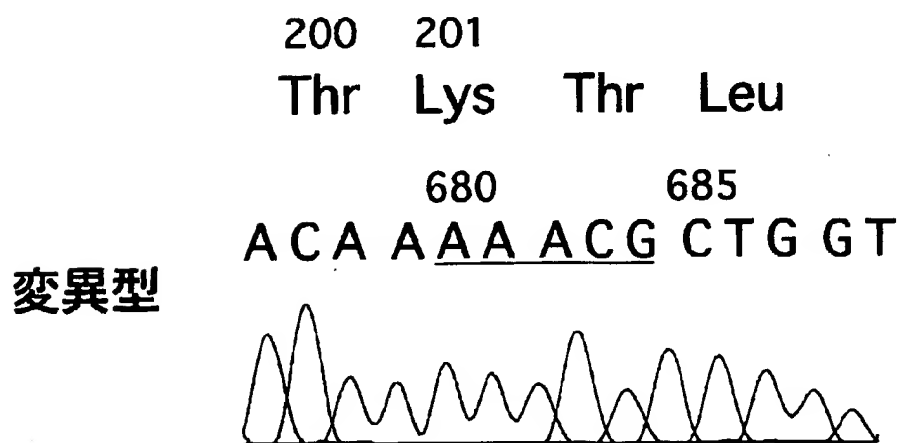
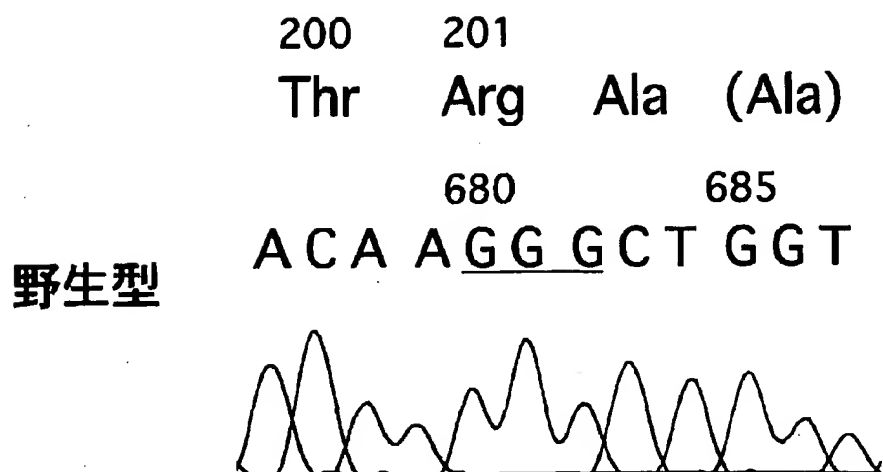
535

AAG CTG C / C CTG CAT

C



第 5 図



第 6 図

282

Arg

Asp Gly / Leu Met

Cys

922

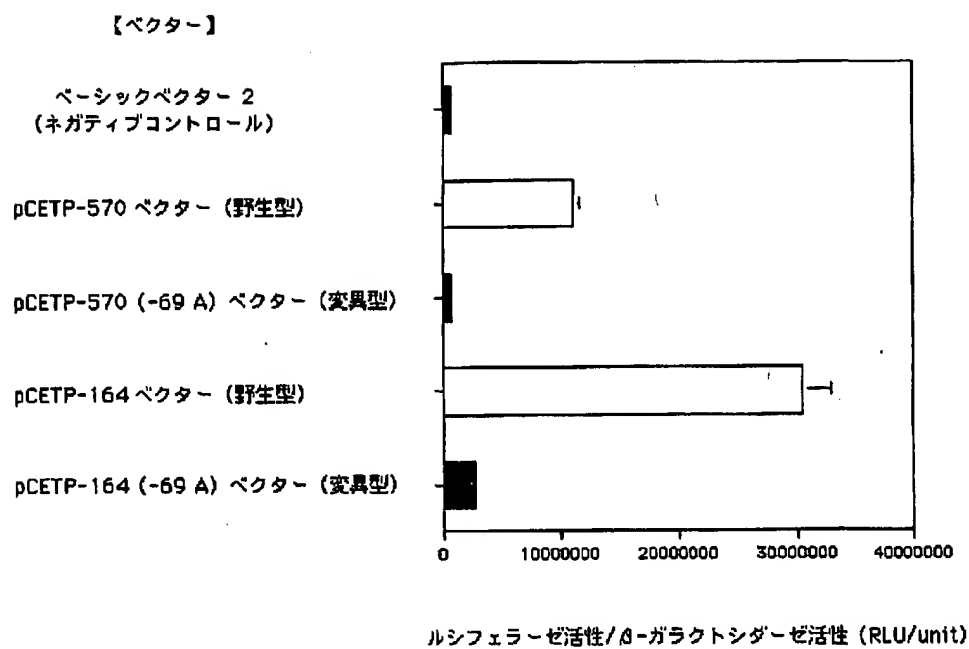
920 C 925 930

GAT GGC / GC CTC ATG

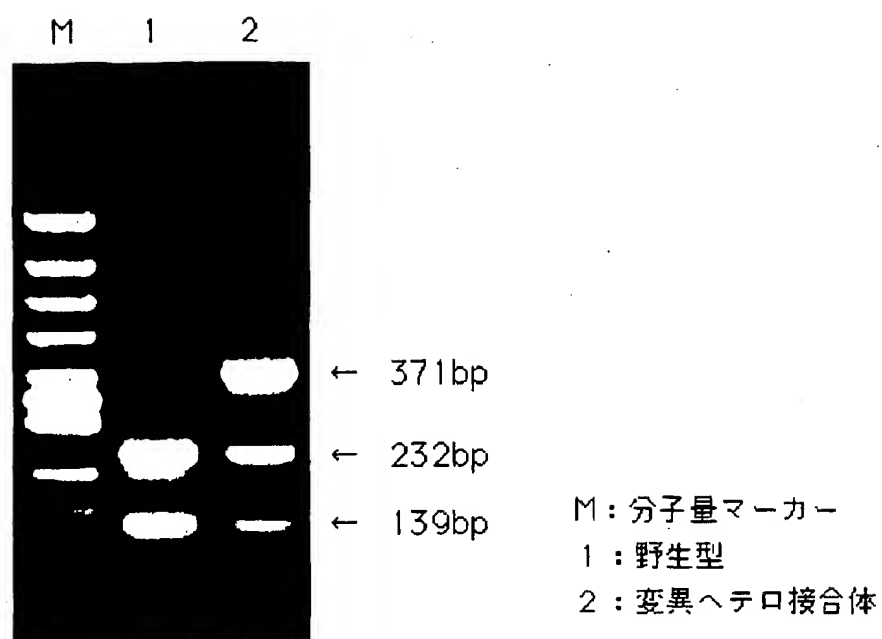
T



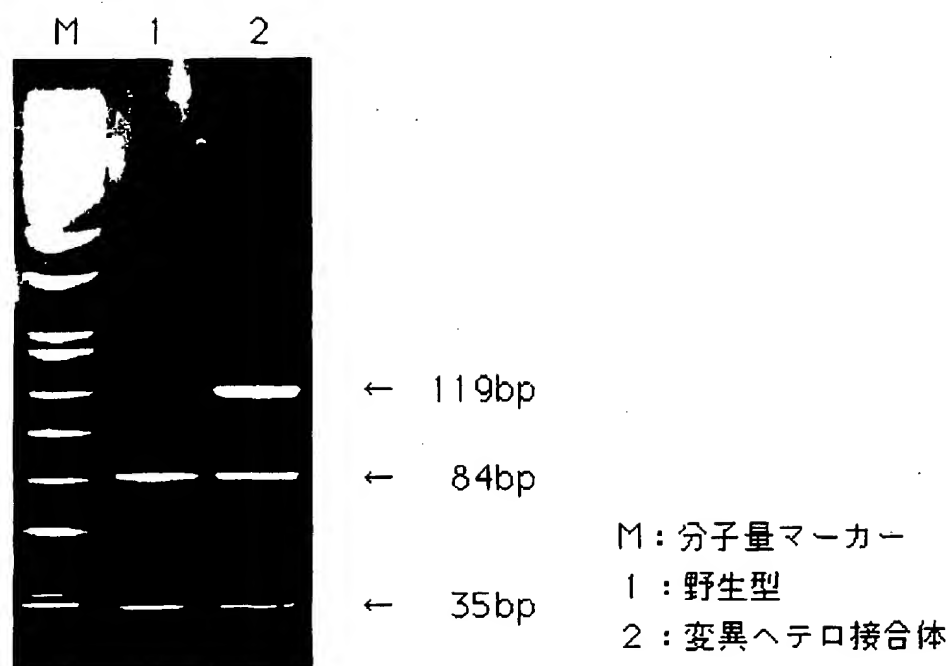
第 7 図



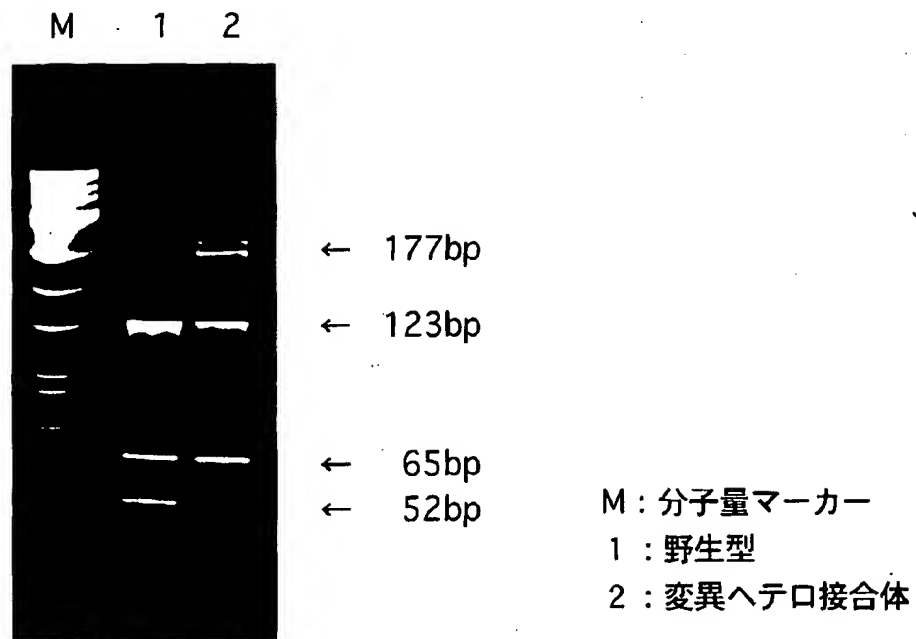
第 8 図



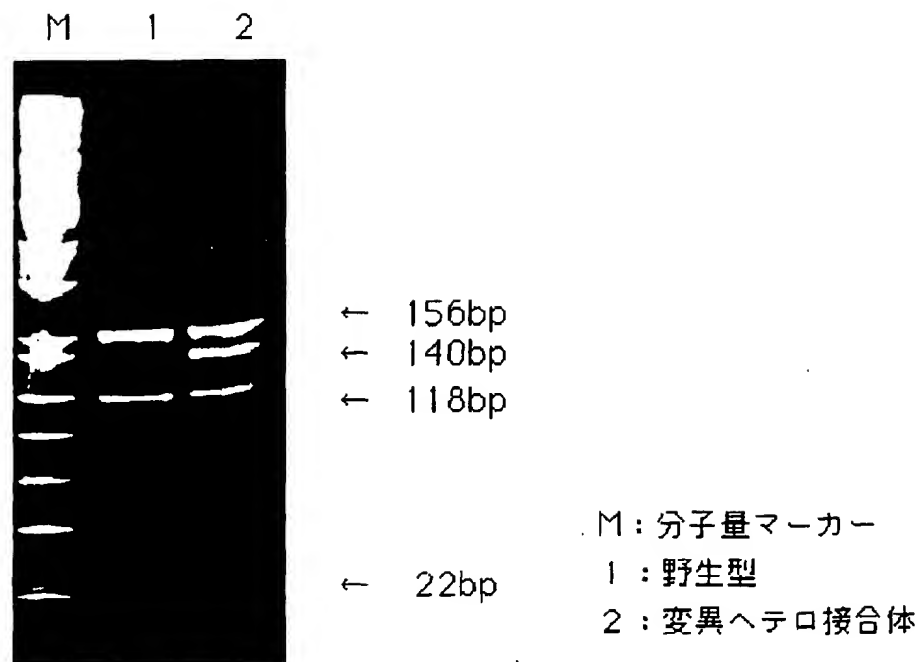
第 9 図



第 10 図



第 11 図



SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.

<120> Method of Detecting Risk Factor for Onset of Arteriosclerosis

<130> PBM38/PCT

<140>

<141>

<150> JP P2000-084264

<151> 2000-03-24

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2166

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (28).. (1506)

<400> 1

-360 tgtctttttctcatagtcattgtattttggcctctttctatttatggcaacagagagaga -301

-300 aagcttattcctagatatatgtatttaagtaaaaataaatgaattcatggaaacatatta -241

-240 agcaattatccagataacataagggatggcaaaaatggtgcagatggtggaggggagaca -181

-180 agtagaagttggggtgctcttgttgaatgtctggctctgaactctagaggaggccgcagg -121

-120 ggctgggcaggaaggaggtgaatctctggggccaggaagaccctgctgcccgaagagcc -61

-60 tcatgttccgtgggggctgggaggacatacatatacgggctccaggctgaacggctcggg -1

ccacttacac accactgcct gataacc atg ctg gct gcc aca gtc ctg acc ctg 54
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu

gcc ctg ctg ggc aat gcc cat gcc tgc tcc aaa ggc acc tcg cac gag 102
Ala Leu Leu Gly Asn Ala His Ala Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu
1 5

gca ggc atc gtg tgc cgc atc acc aag cct gcc ctc ctg gtg ttg aac 150
Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn
10 15 20

cac gag act gcc aag gtg atc cag acc gcc ttc cag cga gcc agc tac 198
His Glu Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr
25 30 35 40

cca gat atc acg ggc gag aag gcc atg atg ctc ctt ggc caa gtc aag 246
Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met Met Leu Leu Gly Gln Val Lys
45 50 55

tat ggg ttg cac aac atc cag atc agc cac ttg tcc atc gcc agc agc 294
Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser His Leu Ser Ile Ala Ser Ser
60 65 70

cag gtg gag ctg gtg gaa gcc aag tcc att gat gtc tcc att cag aac 342
Gln Val Glu Leu Val Glu Ala Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn
75 80 85

gtg tct gtg gtc ttc aag ggg acc ctg aag tat ggc tac acc act gcc 390
Val Ser Val Val Phe Lys Gly Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala
90 95 100

tgg tgg ctg ggt att gat cag tcc att gac ttc gag atc gac tct gcc 438
Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala
105 110 115 120

att gac ctc cag atc aac aca cag ctg acc tgt gac tct ggt aga gtg 486

Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val	
125	130 135
cgg acc gat gcc cct gac tgc tac ctg tct ttc cat aag ctg ctc ctg	534
Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu	
140	145 150
cat ctc caa ggg gag cga gag cct ggg tgg atc aag cag ctg ttc aca	582
His Leu Gln Gly Glu Arg Glu Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr	
155	160 165
aat ttc atc tcc ttc acc ctg aag ctg gtc ctg aag gga cag atc tgc	630
Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys	
170	175 180
aaa gag atc aac gtc atc tct aac atc atg gcc gat ttt gtc cag aca	678
Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile Met Ala Asp Phe Val Gln Thr	
185	190 195 200
agg gct gcc agc atc ctt tca gat gga gac att ggg gtg gac att tcc	726
Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser	
205	210 215
ctg aca ggt gat ccc gtc atc aca gcc tcc tac ctg gag tcc cat cac	774
Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His	
220	225 230
aag ggt cat ttc atc tac aag aat gtc tca gag gac ctc ccc ctc ccc	822
Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro	
235	240 245
acc ttc tcg ccc aca ctg ctg ggg gac tcc cgc atg ctg tac ttc tgg	870
Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp	
250	255 260
ttc tct gag cga gtc ttc cac tcg ctg gcc aag gta gct ttc cag gat	918
Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser Leu Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp	
265	270 275 280

ggc cgc ctc atg ctc agc ctg atg gga gac gag ttc aag gca gtg ctg 966
 Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu
 285 290 300

gag acc tgg ggc ttc aac acc aac cag gaa atc ttc caa gag gtt gtc 1014
 Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val
 300 305 310

ggc ggc ttc ccc agc cag gcc caa gtc acc gtc cac tgc ctc aag atg 1062
 Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val Thr Val His Cys Leu Lys Met
 315 320 325

ccc aag atc tcc tgc caa aac aag gga gtc gtg gtc aat tct tca gtg 1110
 Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly Val Val Val Asn Ser Ser Val
 330 335 340

atg gtg aaa ttc ctc ttt cca cgc cca gac cag caa cat tct gta gct 1158
 Met Val Lys Phe Leu Phe Pro Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala
 345 350 355 360

tac aca ttt gaa gag gat atc gtg act acc gtc cag gcc tcc tat tct 1206
 Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser
 365 370 375

aag aaa aag ctc ttc tta agc ctc ttg gat ttc cag att aca cca aag 1254
 Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys
 380 385 390

act gtt tcc aac ttg act gag agc agc tcc gag tcc gtc cag agc ttc 1302
 Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe
 395 400 405

ctg cag tca atg atc acc gct gtg ggc atc cct gag gtc atg tct cgg 1350
 Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg
 410 415 420

ctc gag gta gtg ttt aca gcc ctc atg aac agc aaa ggc gtg agc ctc 1398

Leu Glu Val Val Phe Thr Ala Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu
 425 430 435 440

 ttc gac atc atc aac cct gag att atc act cga gat ggc ttc ctg ctg 1446
 Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu
 445 450 455

 ctg cag atg gac ttt ggc ttc cct gag cac ctg ctg gtg gat ttc ctc 1494
 Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
 460 465 470

 cag agc ttg agc tagaagtctc caaggaggtc gggatggggc ttgtagcaga 1546
 Gln Ser Leu Ser
 475

 aggcaagcac caggctcaca gctggaaccc tgggtgtctcc tccagcgtgg tggaagtgg 1606

 gttaggagta cggagatgga gattggctcc caactcctcc ctatcctaaa ggcccactgg 1666

 cattaaagtg ctgtatccaa gagctgcgga gtccttcttc tgtggctggc gggtagaggg 1726

 ggggggaagg gattgtctca ccagtgccgt ccacctcttt tcagcccttc caagcagctg 1786

 cccccaacc ctccaagctt 1806

<210> 2

<211> 476

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile Thr
 1 5 10 15

Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile Gln
 20 25 30

Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala
 35 40 45
 Met Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile
 50 55 60
 Ser His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala Lys
 65 70 75 80
 Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly Thr
 85 90 95
 Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser
 100 105 110
 Ile Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln
 115 120 125
 Leu Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys Tyr
 130 135 140
 Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu Pro
 145 150 155 160
 Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys
 165 170 175
 Leu Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn
 180 185 190
 Ile Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
 195 200 205
 Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile Thr
 210 215 220
 Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys Asn
 225 230 235 240

Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly
 245 250 255

Asp Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser
 260 265 270

Leu Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu Met
 275 280 285

Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr Asn
 290 295 300

Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln
 305 310 315 320

Val Thr Val His Cys Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys
 325 330 335

Gly Val Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro Arg
 340 345 350

Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Val
 355 360 365

Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu
 370 375 380

Leu Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val
 405 410 415

Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe Thr Ala Leu
 420 425 430

Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu Ile

435

440

445

Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro

450

455

460

Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser

465

470

475

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cttctgtgct ccaggagga ctca

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cagtttcccc tccagccac acat

24

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cagcaaaggc gtgagcctcg tc

22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

cccaggaatc ctgtctgggc c

21

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

aaaatggtgc agatggtgga ggg

23

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aatccctata cctggctgtt tgca

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

agccctcatc cactgccctc c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10
ctgttcctcc cgccacccta c 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cccaacatcc ttcttcactt cca 23

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
agacctcatt cagccctcca cc 22

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
cctggtggta agcattcctg tca 23

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
tggacacact aacaggatgg gca 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

caggggctca ttgtggtgct

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gaccacaggg agtcagccag

20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tgccactccc accttctcca tg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gctcccactg ctgtcttctg ag

22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ggttgggtag ctgtgtggat gc

22

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tgacagaagc cgaataagcc ctc

23

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

acacagggtc cagccagcgt c

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tcctctctcc ccatgcgtgt g

21

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ggactttact ccacccacc

19

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

ggattgggggt acgtgagata aac

23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

ccgagctact tccttttccc agc

23

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

agtcagttcc cccaccacca cc

22

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

agggttgctc tctgcttcgg ga

22

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

gagttgaccg ccccttctc tt

22

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ggaagataag accctgccta gata

24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

cttatttccc ccagtctatc caag

24

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

cttctgtgct ccagggagga ct

22

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

gggccaggac cgctaagta

19

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

ccaagaaggg ctgactgggg ct

22

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

acaccagggt tccagctgtg a

21

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

cagcacttgg tcatctggtc ac

22

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gtaagtggtc cgagccgttc agcctgga

28

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

agttggggta cccttggtga atgtctggct ctgaactc

38

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gatgcaactg atacttacac aaccag

26

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

atgccctga ctgctacctg tctttccata agcagc

36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K. Takahashi et al., "A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins", J. Clin. Invest., Vol. 92, No. 4, (1993), pages 2060 to 2064	1, 2
A	T. Arai et al., "A novel nonsense mutation (G181X) in the human cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects", J. Lipid. Res., Vol. 37, No. 10, (1996), pages 2145 to 2154	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 June, 2001 (19.06.01)	Date of mailing of the international search report 10 July, 2001 (10.07.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12Q 1/68, C12N 15/12		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12Q 1/68, C12N 15/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	K. Takahashi et al. "A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins" J. Clin. Invest., 第92巻 第4号 (1993) p. 2060-2064	1, 2
A	T. Arai et al. "A novel nonsense mutation (G181X) in the human cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperal phalipoproteinemic subjects" J. Lipid. Res., 第37巻 第10号 (1996) p. 2145-2154	1, 2
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	19.06.01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448